

XXXI. OTDK Biológia Szekció

MELANOMA SEJT VEZÉRELTE EXOSZÓMÁK IMMUNMODULÁNS HATÁSAINAK VIZSGÁLATA

Temesfői Viktória

Biológus MSc 2. évfolyam

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai Kar**

MTA SzBK Biokémiai Intézet

Témavezetők: Dr. Buzás Krisztina, Dr. Duda Ernő
Konzulens: Dr. Gácsér Attila

2012.

Összefoglalás

Rákos betegségek lefolyásában jelentős szerepe van a tumor mikrokörnyezetének, melyet a daganat az általa termelt citokinek és egyéb faktorok révén alakít ki. Ezen faktorok hatására a környezetben akkumulálódott és aktiválódott leukociták nem képesek az effektív, daganatellenes válaszra, attól eltérő polarizációs állapotba kerülnék. A polarizáció iránya kedvez a rákos sejtek túlélésének és metasztatizis képzésének.

A daganatok – köztük az inváziós és metasztatikus képességeiről ismeretes malignus melanoma – számos stratégiával képesek megkerülni az immunfelügyeletet, ezek közül egyik talán a nagy mennyiségű exoszóma kibocsátás, mellyel immunmoduláns hatást fejtenek ki a tumor asszociált leukocitákra. Az exoszómák 30-100 nm-es membrán vezikulák, *in vivo* szerepük sokrétű, intenzíven kutatott.

Kísérleteinkben B16F1 melanoma sejtvonalból tisztított exoszómákat vetettünk alá strukturális vizsgálatnak és követtük nyomon immunmoduláns funkcióikat *in vitro*:

- I.** Makrofág sejteket indukáltunk B16F1 exoszómákkal, majd vizsgáltuk NF- κ B transzkripciós faktor aktivitásukat és citokin, kemokin termelésüket.
- II.** Melanoma exoszómákkal előkezelt csontvelői dendritikus sejteket inkubáltunk együtt lépből tisztított T-sejtekkel, majd vizsgáltuk a T-sejtek proliferációs rátáját.

Eredményként a melanomából származó exoszómák a makrofágok NF- κ B aktivitásának növekedését illetve tumor támogató tulajdonságú citokinek és kemokinek termelődését indukálták. Elősegítették csontvelői eredetű dendritikus sejtek aktiválódását, melyek a tisztított CD4⁺ T-sejtek fokozott osztódását eredményezték.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy a tumor exoszómák interakcióba léptek a makrofágokkal és a dendritikus sejtekkel, illetve azokat a tumor fejlődését propagáló, immunszuppresszív működési irányába terelték.

Tartalomjegyzék

Összefoglalás	2.o.
Tartalomjegyzék	3.o.
Rövidítések	4.o.
Bevezetés	5.o.
<i>A melanoma epidemiológiája</i>	5.o.
<i>A melanoma és mikrokörnyezete</i>	7.o.
<i>Az exoszómák</i>	9.o.
<i>Makrofágok és szerepük a tumor-mikrokörnyezetben</i>	12.o.
<i>Dendritikus sejtek és T-sejtek a tumor-mikrokörnyezetben</i>	16.o.
Célkitűzés	19.o.
Anyagok, módszerek	20.o.
Eredmények	24.o.
Diszkusszió	29.o.
Nyilatkozat	32.o.
Köszönetnyilvánítás	33.o.
Irodalomjegyzék	34.o.

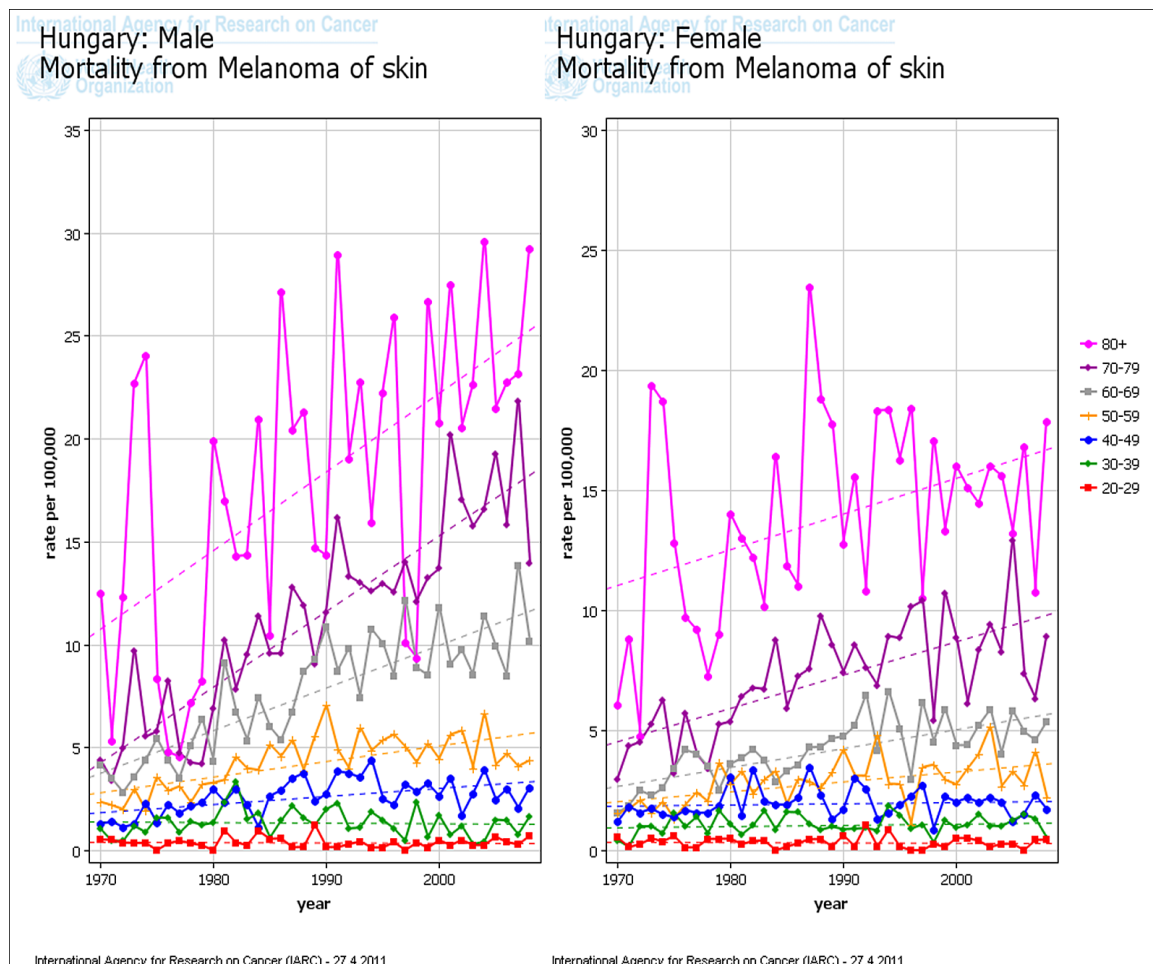
Rövidítések

MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
NO	nitrogén-oxid
MDSC	mieloid eredetű szupresszor sejt
Treg	regulátoros T-sejt
TAM	tumor asszociált makrofág
DC	dendritikus sejt
HIF-1	hipoxia indukálta faktor-1
Hsp	hősokk protein
MVB	multivezikuláris test
FasL	Fas ligand
APO2/TRAIL	TNF-kapcsolt apoptózis ligand
HLA-DR	humán leukocita antigén DR variánsa
TGF β	transzformáló növekedési faktor β
TNF α	tumor nekrosis faktor α
GM-CSF	granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor
MMP	mátrix metalloproteináz
VEGF	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
NK	természetes ölő sejt
IFN γ	interferon γ
LPS	lipopoliszacharid
RNI	reaktív nitrogén intermedier
ROI	reaktív oxigén intermedier
PAMP	patogén asszociált molekuláris mintázat
DAMP	veszély asszociált molekuláris mintázat
TLR	Toll-like receptor
NF- κ B	nuclear factor- κ B
I κ B	inhibítoros κ B fehérje
MAPK/AP1	mitogén aktivált protein kináz / asszociált protein 1
JAK	Janus kináz
STAT	transzkripció szignál transzducér és aktivátor protein
LT β R	limfotoxin- β receptor

Bevezetés

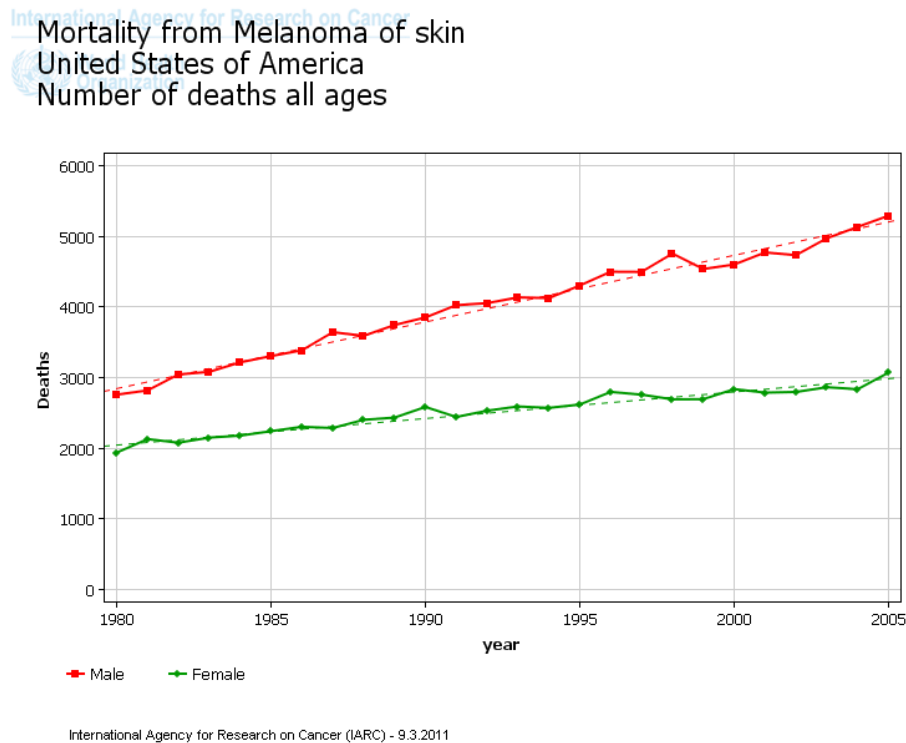
A melanoma epidemiológiája

A humán populáció és az átlagéletkor növekedésével a rákos, ezen belül melanomás megbetegedések egyre gyakoribbak. A betegség kialakulásában a genetikai hajlamosító tényezők mellett nagy szerepet játszanak a megváltozott környezeti és életmódbeli feltételek is. A European Cancer Observatory 2008-as Magyarországra vonatkozó adatai alapján a bőr malignus melanomája előfordulását tekintve a 11. helyen áll a rákos megbetegedések között és gyakorisága a mortalitással együtt egyre nő.



1. ábra. A melanoma mortalitási rátája 100.000 főre vonatkoztatva Magyarországon, életkoronként férfiak és nők esetében, 1970-től napjainkig. (forrás: IARC)

Az Amerikai Egyesült Államokban 2010-es adatok szerint a melanoma férfiakban az ötödik, nőkben a hetedik leggyakrabban diagnosztizált ráktípus, előfordulása gyorsabban nő, mint más rákbetegségeké. Incidenciája általánosságban évenként 3,1%-ot emelkedett ($p < 0,001$) az utóbbi 20 évben. 2005-től 2007-ig terjedő adatokra támaszkodva megalkotott becslések szerint a 2010-ben születettek 1,93%-ánál várható, hogy diagnosztizálják a betegséget életük során. (1)



2. ábra. Melanoma mortalitási rátája az Egyesült Államokban 1980-tól napjainkig, a teljes populációra vonatkoztatva, férfiak és nők esetében. (forrás: IARC)

Az erősen pigmentált populációban jelentősen kisebb az előfordulás gyakorisága, mint a gyengén pigmentált, fehér bőrű europid rasszban. (2) Annak ellenére, hogy patomechanizmusa intenzíven kutatott, valóban hatékony módszer még nem érhető el a kezelése terén.

A melanoma és mikrokörnyezete

A melanoma normál prekursor sejtje a dúcléc eredetű melanocita. Legfontosabb *in vivo* fiziológiai funkciója egy pigmentált bipolimer – a melanin – termelése, melynek feladata a szervezet védelme az ultraibolya (UV) sugárzástól. A bőrben általában egyenletesen elosztva található. A melanociták daganatos transzformációja intenzíven tanulmányozott, de nem teljesen megfejtett, valószínűleg igen nagy szerepet játszik benne a bőrfelületet érő UV sugárzás.

A melanoma fejlődésében szöveti kritériumokra alapozva öt stádiumot különböztetnek meg:

- szerzett és veleszületett anyajegy/pigmentfolt rákos elváltozás nélkül
- diszpláziás jellegű folt strukturális rendellenességgel
- radiális növekedési fázis
- vertikális növekedési fázis
- metasztatikus fázis.

Feltételezhetően az átmenet a radiális növekedésből vertikálisba (a bazális lamina áttörése) igen fontos állomása a tumor progressziójának, ami előjelzi a metasztatikus potenciált és a kedvezőtlen kimenetelt.

A metasztázis folyamata általában azzal kezdődik, hogy a daganatsejtek a primer tumor oldalán elhelyezkedő legközelebbi nyirokcsomóba vándorolnak. Innen terjednek szét a nyirok és vérerek útján a szervezetben. Majdnem minden szervben képesek megtapadni, gyakrabban pl. májban, lépben, agyban, de különösen nagy számban képeznek áttétet a nyirokcsomókban és a tüdőben. A megelőzés mellett a primer tumor lehető legkorábbi felismerése és kezelése adja az egyedüli kilátást a hatékony terápiára, ugyanis az áttétképző daganatos betegség terápiás lehetőségei még meglehetősen limitáltak. (2)

Ahhoz, hogy a daganat a szervezetben képes legyen fennmaradni és terjedni, meg kell kerülnie a gazdaszervezet immunrendszerének védelmi vonalait. A melanomáról tudott, hogy immunogén tumor; expresszálja a MelanA/ MART-1, gp100 antigéneket, melyeket a citotoxikus T-sejtek MHC I (fő hisztokompatibilitási komplex I) molekulán prezentálva felismernek és ennek megfelelően az immunrendszer a kezdeti stádiumban képes akadályozni a daganat növekedését. Számos tanulmány kimutatta, hogy a

melanoma képes elkerülni és lokálisan elnyomni a tumor ellenes immunválaszt az általa termelt immunszuppresszív faktorok segítségével, valamint a tumor progressziót elősegítő mikrokörnyezetet létrehozni. Ilyen faktorok pl. a CCL2, CCL5, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL10 kemokinek, növekedési faktorok, interleukin (IL)-1,-6,-10, proszttaglandinok, nitrogén-oxid (NO). (3,4,5) Tumorsejtek „escape” mechanizmusának része ezen kívül a tumor antigének / MHC I hisztokompatibilitási komplex expresziójának csökkentése, immunszuppresszív sejtek - többek között mieloid eredetű szupresszor sejtek (MDSC), regulátoros T-sejtek (Treg), tumor asszociált makrofágok (TAM), regulátoros / tolerogén dendritikus sejtek (DC), N2 polarizált neutrofil sejtek - akkumulációjának, aktivációjának irányítása a mikrokörnyezetben, illetve megnövekedett mennyiségű mikrovezikula kibocsátása. A daganat közelébe toborzott sejtek maguk is termelnek szupresszív faktorokat és képesek autokrin, parakrin módon stimulálni a tumorsejtek kemokin, citokin termelését. (5,6,7)

Mindebből következően az immunszuppresszivitásért felelős komplex hálózat alapja a tumor mikrokörnyezetében fellépő krónikus gyulladásos állapot, mely a tumor- és sztróma sejtek termelte anyagok eredményeként jön létre. (5) A pro-inflammatorikus mediátorok jelenléte mellett a tumor környezetének jellemzője az alacsony pH, a tápanyag és oxigénhiány; mindez együtt szelekciós nyomást fejt ki a tumorsejtekre. Pl. a hipoxia indukálja a hipoxia indukálta faktor-1 α -t (HIF1 α), ami elősegíti a sejt-mátrix interakciót, inváziót, angiogenezist. Melanomában stimulálja a Notch1-et, ami a β -katenin, a PI3 kináz és az Erk útvonal aktivációján át az N-kadherin emelkedett expressziójához vezet, segítve a daganatsejtek adhézióját, terjedését. (8)

Újabb kutatások egyre inkább rávilágítanak, hogy az eredményes daganatterápiák érdekében nem elégséges egyedüli célpontként magukat a tumor sejteket támadás alá venni, hanem mindenképpen szükséges a daganatokat övező gyulladásos állapot kezelése. Fontos megérteni a sztróma, az asszociált sejtek és a daganat kapcsolatát. (7,9) Kutatásunk során a számos elkerülő mechanizmus közül a tumor sejtek fokozott exoszóma szekrécióját és az kibocsátott mikrovezikulák immunmoduláns funkcióit vizsgáltuk, melyek révén a tumor mikrokörnyezetben lévő és a szervezet távolabbi immunsejtjeinek működését képesek befolyásolni.

Az exoszómák

Az exoszómák számtalan sejtípus által szekretált, 40-100nm átmérőjű membrán vezikulák. *In vivo* fiziológiai funkciójuk még nem tisztázott minden vonatkozásában, de kétségtelenül fontos szerepet töltenek be többek között az immunsejtek intercelluláris kommunikációjában, a szöveti fejlődésben, valamint egyes tanulmányok szerint a tumorsejtek által kibocsátott exoszómák segítik a daganat menekülési mechanizmusait. (10,11,12,13,14)

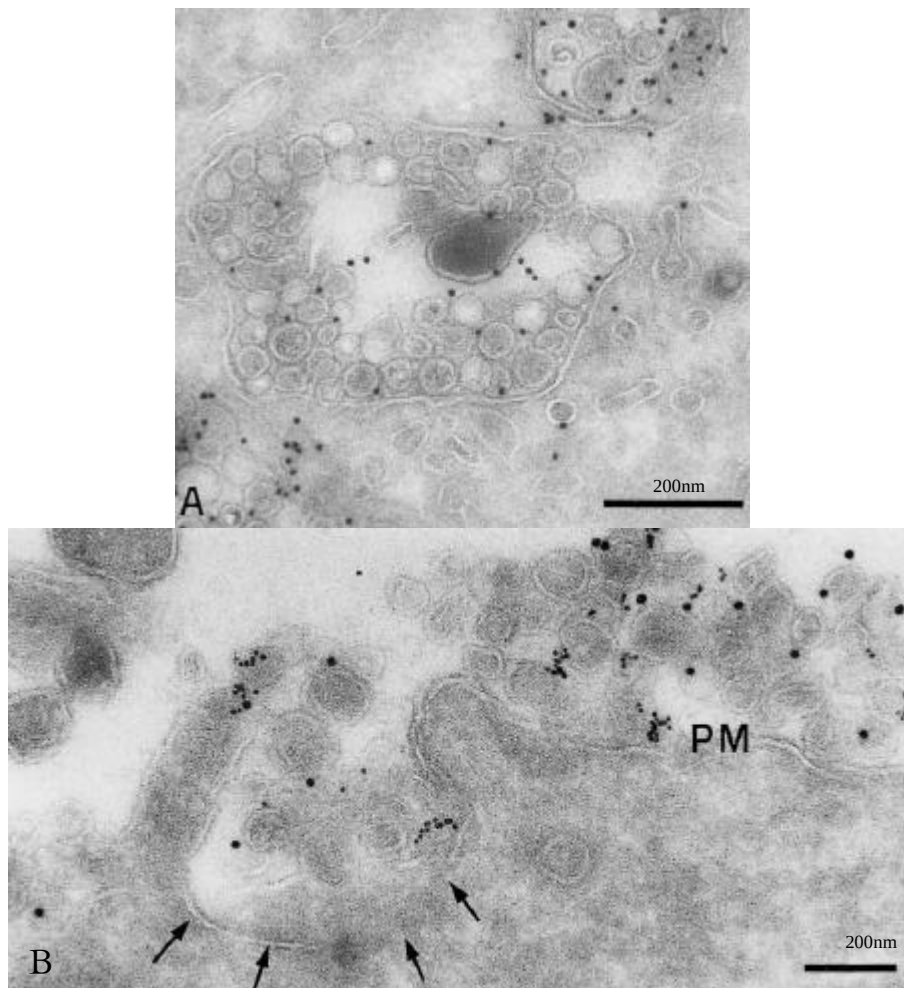
Képződésük az endoszómális rendszerre vezethető vissza, ami elsődleges endocitotikus vezikulákból, korai és késői endoszómákból valamint lizoszómákból áll. Az endocitotikus vezikulák utat jelentenek a környezetből származó anyagoknak a sejt belseje felé, a lizoszómák a lumenükbe jutott molekulák lebontásáért felelősek. Az endoszómák „sorting-organellumok”, tartalmukat - transzport vezikulák segítségével - különböző célok felé továbbítják, mint pl.: az apikális vagy bazolaterális plazmamembrán.

A korai endoszómákból képződnek a későiek, melyek gyakran multivezikuláris testekként (MVB) figyelhetők meg. Nevük megnövekedett méretükre és a belsejükben akkumulált – membránjukról befelé lefűződő – vezikulák százaira utal. Három lehetséges funkciójuk ismert;

- MVB - lizoszóma fúzió esetén fehérjék, lipidek lizoszómába juttatása,
- különböző anyagok időleges tárolása,
- plazmamembránnal való fúzió során a belső vezikulák extracelluláris térbe ürítése.

Az utóbbi módon kijuttatott membrán kompartmentek az exoszómák. A célsejtbe endocitózissal kerülnek vagy egybeolvadhatnak a célsejt membránjával, amely így új felületi és adhézis molekulákra tehet szert. A fúzió során proteinek és citoszol cseréje is végbe megy. Számos tanulmány támasztja alá, hogy nagy valószínűséggel fontos szerepük van az immunválasz során a sejtek közötti kommunikációban. Molekuláris összetételük függhet a kibocsátó sejt típusától, például B-limfocita, DC, hízósejt és bélepithél sejtekből származó exoszómák membránjai gazdagon tartalmaznak MHC I és II molekulákat. Gyakran előforduló fehérjék például a Hsp73, Hsp90 chaperonok (hősokk

proteinek), trimer G-protein alegységek, citoskeletális proteinek, tetraspaninok (CD9, CD63, CD81, CD82), Fas ligand (FasL), TNF-kapcsolt apoptózis ligand (APO2/TRAIL). (10,11,12,13,14)



3. ábra. A. Dendritikus sejtben képződő multivezikuláris test. B. MVB B-sejtben a plazmamembránnal (PM) fúzionálva exoszómákat juttat az extracelluláris térbe. Mindkét kép ultravékony fagyasztva metszett elektron mikroszkópos metszetről készült, melyen az MHC II. molekulák immunogold antitesttel jelöltek.

(10)

Kísérletes munkánk szempontjából az exoszómák daganatos folyamatokban betöltött szerepének tanulmányozása került előtérbe. Tumoros sejtvonal felülszójából és tumoros betegek testfolyadékokaiból izolált exoszómák egyértelmű gátló hatást fejtenek ki immunsejtekre *in vitro*, pl. a szignalizáció, osztódás, citotoxicitás és az apoptózis indukciója terén. (15) B-sejtből származó exoszómák által hordozott, peptid-kötött MHC II molekulák *in vitro* stimulálták a CD4+ T sejteket. (16) Tumor sejtek termelte

exoszómák tumor antigéneket hordoznak, melyek miután dendritikus sejtbe kerülnek, kiváltják a CD8⁺ T-sejt függő anti-tumor választ. (17) Ezen adatokon alapul azon elmélet, mely szerint az exoszómák esetleg felhasználhatóak tumor ellenes vakcinák kialakításához, mivel antigénforrást jelentenek a T-sejtek aktiválásához (18), bár a menekülési mechanizmusokban betöltött szerepük ezeknek a sikerességét kétségessé teszi. Dendritikus sejt által kibocsátott exoszómák CD86 differenciációs markert hordoznak, ami fontos ko-stimulációs molekula a T-sejtek számára. (19) Rákos betegek perifériás vérében aktivált T-limfociták pusztulását figyelték meg, mely visszavezethető a tumorból származó exoszómákra a FasL és az APO2/TRAIL proteinek jelenlétére. (15) A CD8⁺ T-sejtek kifejezett céljai az exoszómák okozta FasL mediált apoptózisnak. A különbség a CD8⁺ és CD4⁺ sejtek között talán magyarázható a kaspáz 8 Th2 sejtekben előforduló részleges hasadásával. (11)

In vitro és *in vivo* bizonyított, hogy tumorsejtek fokozottan bocsátanak ki exoszómákat, ezzel pedig a szolubilis faktorok szekréciója és a sejt-sejt kapcsolatok mellett egy alternatív útvonalat nyernek mikrokörnyezetük és a gazdaszervezet immunválaszainak átalakítására. Mivel az exoszómák rendelkeznek a kibocsátó sejt protein repertoárjának egy részével, a tumorokból származó exoszómákban találhatunk olyan molekulákat, melyek részt vesznek az immunszuppressziós útvonalakban, így erőteljes hatással vannak az antigén prezentáló sejtek működésére is. Ezek a mikrovezikulák nem csak károsítják a CD14⁺ monociták differenciációs képességeit érett DC felé, hanem eltérítik a differenciációt olyan monociták irányába, melyek alacsony mennyiségben vagy egyáltalán nem expresszálják a humán leukocita antigén DR variánsát (HLA-DR). Ezen sejtek relatív nagy mennyiségben vannak jelen melanomás betegek perifériás vérében és transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) mediált úton szuppresszív hatást fejtenek ki a fehérvérsejtek szaporodására valamint gátolják az effektor molekulák expresszióját, mint pl. perforin és interferon- γ (IFN- γ). CD14⁺ HLA-DR^{neg/low} sejtek mezenchimális őssejteként viselkednek, granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) hatására *in vivo* osztódni kezdenek. Erről a növekedési faktorról tudott, hogy a MDSC-ek differenciációját aktiválják különböző rágcsló tumor modellekben. (18)

Tanulmányok bizonyították, hogy tumor exoszómák fokozzák a targetsejt mátrix-metalloproteináz (MMP) szekrécióját és vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF) expresszióját, ami a tetraspanin család pro-angiogenetikus molekuláknak köszönhető, ezzel angiogenezist előidézve a tumor és környezete felé. (18) Angiogenetikus hatás nem csak szolubilis faktorok által mediáltan indulhat meg, hanem exoszómák hatására is, ugyanis ezen mikrovezikulák képesek dózisfüggő módon is aktiválni az endotél sejteket. (20)

Exoszómák bizonyítottan tartalmaznak messenger, mikro, illetve egyéb nem kódoló RNS-eket, melyek átjuttatásával akár a target sejt proteinszintézisét és génexpresszióját is képesek befolyásolni. (18)

Makrofágok és szerepük a tumor-mikrokörnyezetben

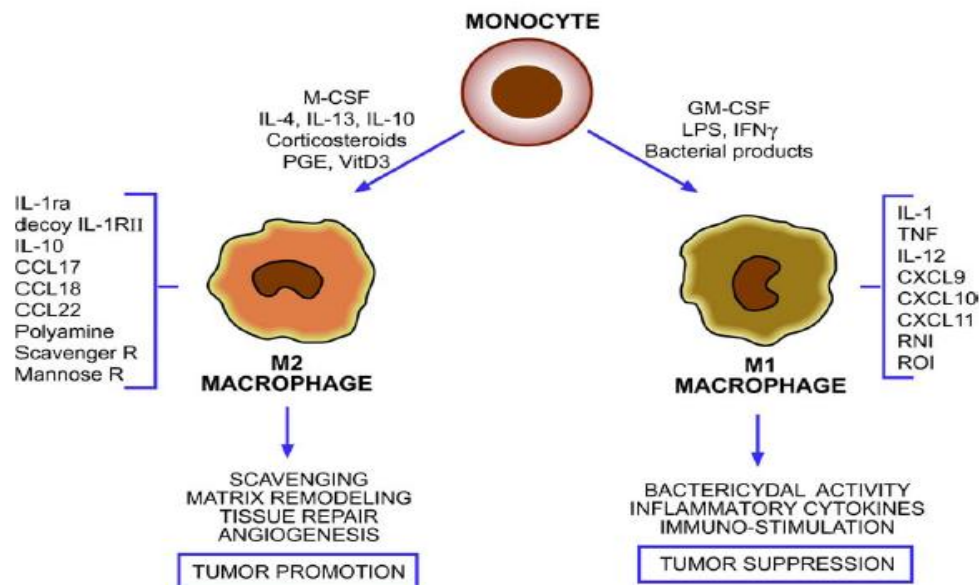
A makrofágok a veleszületett immunrendszer részei, előalakjaik a monociták, melyek a csontvelői mieloid progenitor sejtekből képződnek, érésük makrofággá a szövetekbe jutást követően indul meg. Felismernek, fagocitálnak és elpusztítanak számos szervezetbe jutó patogént. Felismerik a tumoros, a vírussal fertőzött és apoptotizáló sejteket. Regulátor és effektor funkciót látnak el a humorális és celluláris immunválasz során. A fagocitált sejtek és fehérjék antigénjeit feldolgozást követően MHC molekuláikon prezentálják. Rendkívül fontos szerepet játszanak az embrionális élet során a szöveti fejlődéskor apoptotizáló sejtek eltakarításában, ezzel jelentősen hozzájárulva az organogenezis lefolyásához. Közreműködnek normál szövetek mikrokörnyezetében a fiziológiás állapotok irányításában és összerendezésében. Részt vesznek sebek gyógyulási folyamataiban, a szöveti újjáépítésben, csont felépítésben és lebontásában, akut és krónikus gyulladásokban, tumoros folyamatokban. (21, 22)

A környezeti hatásoktól függően több irányba képesek polarizálódni, de nagyban hatással lehetnek rájuk a T-limfociták és természetes ölő sejtek (NK) által termelt kemokinek is. Ezek alapján két elfogadott aktivációs típus különböztethető meg, az M1 és az M2 fenotípus, bár ez nem pontos felosztása azon funkcionalitásoknak, melyekre a makrofágok képesek. Pro-inflammatorikus citokinek és mikrobiális termékek; TNF α , IFN γ , IL-1b, lipopoliszacharid (LPS) hatására a makrofágok M1 irányba polarizálódnak, melynek jellemzője a saját gyulladáskeltő citokinek termelése, reaktív nitrogén

intermedierek (RNI), reaktív oxigén intermedierek (ROI) termelése, anti-mikrobiális és tumor ellenes aktivitás. Anti-inflammatorikus molekulák, pl. glükokortikoid hormonok, Toll-like receptor (TLR) antagonisták, Th2 citokinek (IL-4, IL-13, IL-10), apoptotizáló sejtek és immunkomplexek a makrofágokat az M2 fenotípus felé terelik. Ezen M2 makrofágok valószínűleg szerepet játszanak a sebgyógyulásban, a gyulladás csillapításában, nagy mennyiségben termelnek anti-inflammatorikus citokineket (IL-10, TGF β), nagy fagocitotikus kapacitással rendelkeznek, segítik az angiogenezist és szöveti újjáépülést. Jellegzetességük, hogy LPS stimulusra alacsony mennyiségben termelnek IL-12-t és nagy mennyiségben IL-10-et, expresszálják a mannóz és scavenger-A receptorokat. (21, 23, 24, 25) Számos kísérletes tumor modellben a gyulladásos válasz aktivációja esszenciális a daganatos transzformációhoz és a tumor fejlődéshez. Ennek kapcsán játszhatnak támogató szerepet az M2 irányba polarizált makrofágok. (26)

Ezzel ellentétben a „klasszikus” M1 irányba polarizált makrofágok citotoxikus aktivitást mutatnak tumor sejtekkel szemben, pl. RNI termelésével, TNF receptor család tagjainak (TNF kapcsolt apoptózis ligand) expressziójával. Bevérzéses nekrozis során az endotél sejteket károsítják, ami véralvadás indít be, így a gazdaszervezet szöveteire és tumorokra destruktív hatást fejtenek ki. Előbbi felfedezések vezettek a „makrofág egyensúly” hipotézis felállításához, mely hangsúlyozza a „jó fenotípus” expressziójának fontosságát a „jó időben”. (21, 27)

A TAM-okról tudott, hogy alacsony az antigén prezentáló kapacitásuk és gátolni képesek a T-sejt aktivációt és proliferációt. Regulátoros-, effektor T-sejtek és más, gyulladásban résztvevő sejtek aktivitását erősen gátolják. A T-sejt mediált anti-tumor válasz elnyomása pedig együtt jár a tumor növekedésével, így csökkentve a túlélés esélyeit. Szabályozni képesek az extracelluláris mátrix emésztését, pl. MMP-ok termelésével, megkönnyítve a daganatos sejtek lokális migrációját. Számos, humán tumorokról szóló tanulmány szerint a TAM-ok többségben szaporodnak fel a daganat hipoxiás területein és a hipoxia hatására pro-tumor és pro-angiogenetikus program indul be bennük. Az akkumuláció együtt mozog az angiogenetikus faktorok termelésével és az angiogenezissel. (17, 18, 23, 24)



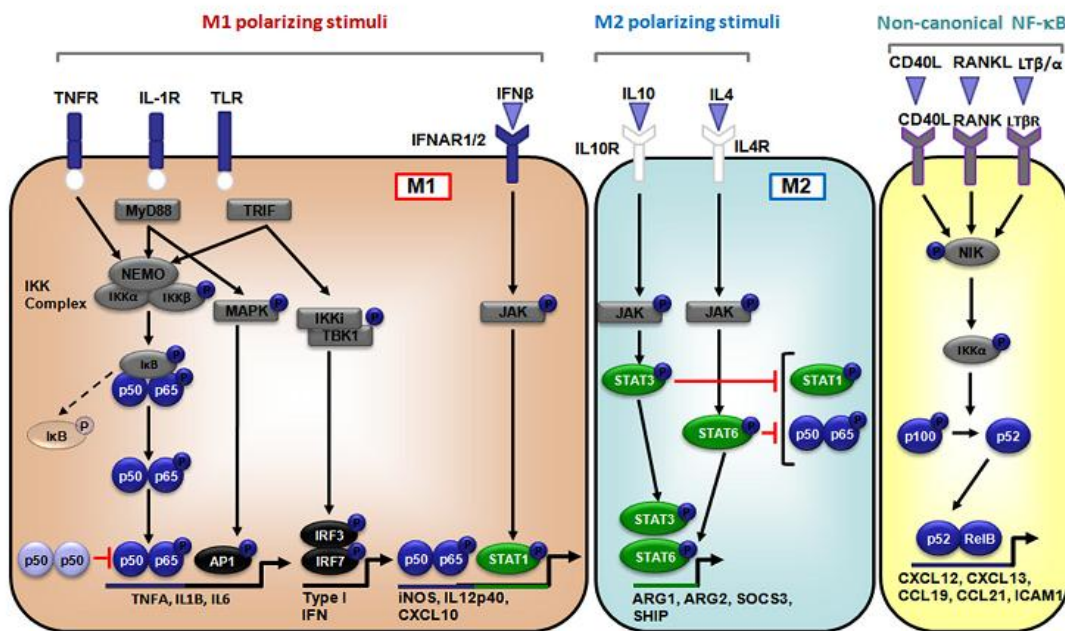
4. ábra. Monociták differenciációja polarizált makrofágokká. Monociták különböző citokinek hatására M1 és M2 polarizált makrofágokká fejlődnek, melyek eltérő képességekkel és citokin profillal rendelkeznek.

(26)

A gyulladásos válasz fontos elemei a makrofágok Toll-like receptorai. A TLR-ok patogén felismerő molekulák, melyek a patogén (PAMP), vagy „veszély” (DAMP) asszociált molekuláris mintázatok felismerésével a veleszületett immunitás aktiválásáért felelősek. Fontos szerepük van a gyulladásos válasz és az adaptív immunitás beindításában az antigén prezentáló sejtek érésének és aktiválásának elősegítésével a szöveti újjáépítésben, szöveti sérülés indukálta gyulladásban, daganatok progressziójában. A TRAIL indukciójával képesek anti-tumor hatású citokinek termelését serkenteni (pl. IFN). A TLR ligandok lehetnek mikrobiális vagy gazdaszervezet eredetűek. Kedvező hatása mellett a TLR szignalizáció tumoros immunválasznál támogatja is a tumor fejlődését. Transzplantált metasztatikus rák egér modelljénél hasüregébe injektált bakteriális LPS hatására a gazdaszervezet makrofágjainak TLR4 aktivációja számos különböző inflammatorikus citokin termelődését indukálta, melyek stimulálták a tüdő metasztázisok növekedését. (21, 25) A TLR-ok, IL-1R, TNFR ligandkötése az NF- κ B útvonal aktivációjához vezet. (22, 23)

Az NF- κ B a Rel transzkripció faktor családba tartozó fehérjék homo-, és heterodimerjeiből épül fel. Ezen fehérjék N-terminálisukon viselik a Rel homodomaint,

ami a DNS kötés és a dimerizáció képességéért felelős. Alap esetben az NF- κ B dimerek I κ B fehérjével kötötten vannak jelen a sejtben, így DNS kötésük gátolt, inaktívak. M1 irányú polarizációs stimulusra a „klasszikusként” leírt útvonal szerint felszabadul az NF- κ B, ami így transzlokálódni tud a magba, köt az inflammatorikus gének promoteréhez és transzkripciót indukál. A gének ko-regulációjáért a MAPK/AP1 útvonal felelős. M2 irányú stimulusokra a Janus kináz (JAK), STAT3, STAT6 útvonalon keresztül beindul számos M2 gén expressziója, miközben gátlódik a STAT1 és defektust keletkezik az NF- κ B aktivációban. E mellett leírtak egy „rendhagyó”, – limfotoxin- β receptoron (LT β R), CD40 vagy RANK receptorokon keresztül – fejlődési szignálokra aktiválódó útvonalat is, mely részt vesz normál folyamatokban, mint pl. a nyirokcsomók fejlődése, osteoclastogenezis. (23)



6. ábra. A makrofágok NF- κ B transzkripciós faktor felé vezető szignalizációs útvonalainak vázlata. (23)

Újabb eredmények szerint a hipoxia – ami a tumoros környezet egyik jellemzője – NF- κ B aktivációt képes előidézni rágszáló és humán makrofágokban. Ennek hatására rágszáló csontvelői eredetű makrofágokban a HIF-1 angiogenetikus gének expresszióját indítja be. Krónikus gyulladásban az inflammatorikus makrofágok NF- κ B aktivációja TNF α és IL-6 kibocsátást eredményez, melyek azonban akár túlélési szignálokat is indukálhatnak tumor sejtekben azok NF- κ B vagy STAT3 aktivációján keresztül. (23)

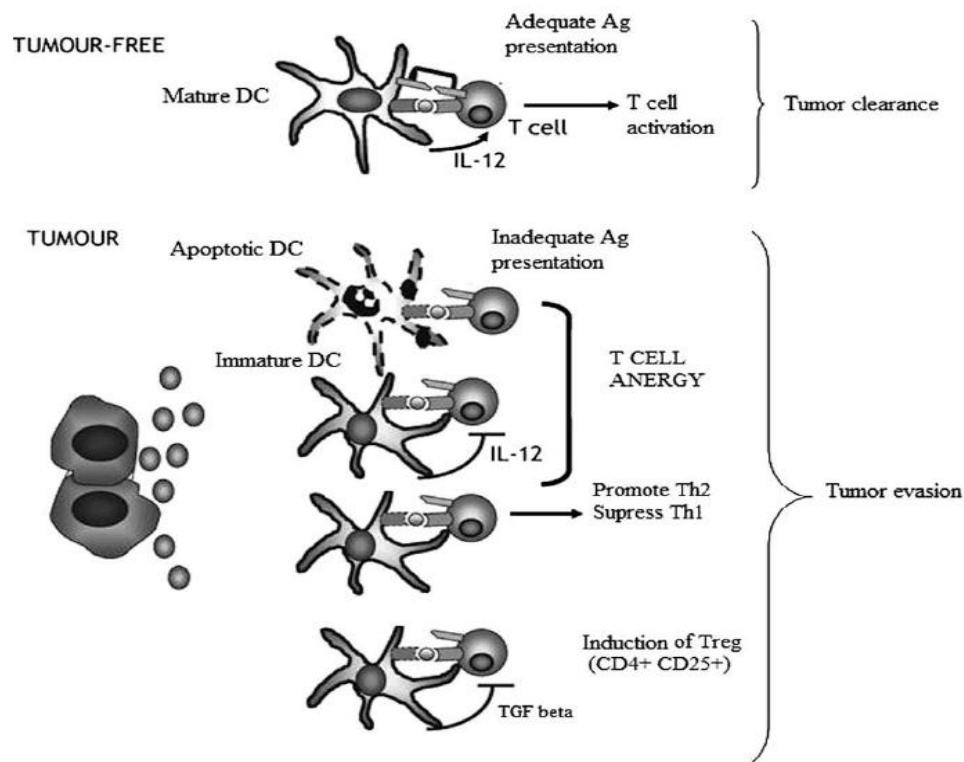
Feltételezések szerint mind a „klasszikus” M2, mind a „rendhagyó” NF- κ B válasz fontos szerepet játszhat TAM-ok immunosuppresszív pro-tumor funkcióinak irányításában, melynek során az asszociált makrofágok együttműködnek a tumorról annak túlélését, osztódását és áttétképzését segítve. (23)

Dendritikus sejtek és T-sejtek a tumor-mikrokörnyezetben

A dendritikus sejtek csontvelői hematopoetikus őssejt eredetű professzionális antigén bemutató sejtek, minden szövetben megtalálhatók, őrszemek hálózatát létrehozva. Gyulladás vagy betegség hiányában a DC-ek a periférián apoptotikus törmelékkel és „saját” származékokkal találkoznak. Ezen félig éretlen DC-ek állandóan monitorozzák a perifériát és prezentálják a saját antigéneket, aminek eredménye a szuppresszív CD4⁺CD25⁺ Treg sejtek aktiválása, melyek képesek elnyomni a saját antigénre reaktív effektor T-sejtek hatását. Ha a szövet integritása sérül, a DC-ek találkoznak a potenciális patogén vagy megváltozott saját antigénekkal. Érésen esnek át, a nyirokutakon vándorolni kezdenek a másodlagos nyirokszervekbe, ahol a T-sejtekkel találkozáskor kostimulációs molekulák segítségével MHC komplexeiken prezentálják a feldolgozott antigént és immunválaszt indukálnak. (22,28,29,30,31) A szöveti és szolubilis környezettől függően a DC-ek citokinek termelésébe kezdenek, irányítva a T-sejtes választ többek között a Th1-es vagy Th2-es irány felé. (22,30,31)

Számos más immunsejthez hasonlóan DC-ek is akkumulálódnak a tumorok mikrokörnyezetében, amely így képes befolyásolni működésüket többek között a tumorok termelte anyagok segítségével. (31,32) A TGF- β gátolja a DC-ek érését és migrációját a nyirokszervek felé, az IL-6, IL-10, prosztaglandinok, gangliozidok és a reaktív oxigén származékok hátráltatják a differenciációt és az érését *in vivo* és *in vitro*. (32) A tumor-asszociált DC-ek alacsony számban expresszálják a kostimulátoros molekulákat, tolerogén / immunosuppresszív aktivitást nyernek, aktívan gátolják az anti-tumor választ, elősegítik Treg sejtek és MDSC-ek megjelenését a környezetben, ennek révén támogatják a tumor fejlődését, a neoangiogenezist és a metasztázis képzést. (31) Melanoma temelte faktorok képesek a tumoros szövettel szembeni tolerancia irányába átprogramozni az asszociált DC-eket. (33)

A dendritikus sejtek megváltozott működésével együtt jár a normálistól eltérő T-sejtes válasz is. (34) Adekvát kostimulációs molekulák hiányában és a megváltozott citokin termelés eredményeként a DC-ek a Th2-es irányába terelik az immunrendszert, míg a Th1-es választ szupresszálják. (32)



7. Dendritikus sejtek működése tumor mentes és tumoros környezetben. (32)

Indukálják a $CD4^+FOXP3^+CD25^{high}$ regulátoros T-sejtek akkumulációját tumorok környezetében, melyek szerepe kettős lehet a betegség fejlődésében. Egyrészt a gyulladás csillapításával segíthetnek az effektív daganatellenes válaszban, másrészt szupresszálni képesek az anti-tumor immunválaszt, így negatív prognosztikus faktort jelentenek daganatos betegek esetében. (35)

Az irodalmi adatok alapján a tumor-mikrokörnyezet számos faktorral képes befolyásolni az immunsejtek működését, azonban nem minden faktorról egyértelműen eldönthető, hogy milyen irányba tereli azokat, illetve hatásuk sokrétű. Az exoszómákról egyértelműen tudott, hogy a tumorokat övező mikrokörnyezet részét képezik.

Immunsejtekre gyakorolt hatásuk tisztázására létrehoztunk két *in vitro* modellrendszert, melyekben makrofágok és dendritikus sejtek viselkedését vizsgáltuk exoszóma indukciót követően. Eredményeink szerint a melanoma exoszómák hatással voltak a makrofágok NF- κ B transzkripciós faktor aktivitására és citokin, kemokin termelésére valamint segítették a dendritikus sejtek érését. Az érett DC-ek képesek voltak fokozni a CD4⁺ T-sejtek proliferációját.

Célkitűzések

Általános cél:

Melanoma sejtvonal által képzett exoszómák struktúrális és funkcionális vizsgálata.

Specifikus célok:

1. Jól reprodukálható és megbízható minőségű exoszóma preparátumok készítése, elektromikroszkópos és atomierő mikroszkópos vizsgálata.
2. Csontvelői eredetű makrofág sejt kultúrákon exoszómák hatására történő változások és citokin termelés vizsgálata *in vitro*.
3. Melanoma exoszómákkal előkezelt csontvelői eredetű dendritikus sejtek hatásának vizsgálata lépből tisztított CD4⁺ T-sejtek proliferációjára *in vitro*.

Anyagok és módszerek

I. Sejtkultúrák

B16F1 melanoma sejtvonala

Melanoma sejtvonala (Murine melanoma cell line, DTP, DCTP Tumor Repository), DMEM (Promo Cell, Cat.No.: C-71221) médiumban tenyésztve, mely tartalmazott 10% FBS szérumot (Lonza, Cat.No.: DE-14-801F), 1% MEM vitaminkészítményt (Promo Cell, Cat.No.: C-42328), valamint 1% MEM NEAA készítményt (Promo Cell, Cat.No.: C-42322).

A sejtek melanintermelése 75 cm² felületű flasksokban, 20 milliós sejtszám elérését követően, 37°C-os inkubációs hőmérsékleten, 5% CO₂ tartalom mellett bizonyult a legeredményesebbnek. Ilyen paraméterek mellett a felülűszók átlagosan 3 nap alatt váltak sötét színűvé, ekkor történt a gyűjtés. A felülűszót felhasználásig -20°C-on tároltuk.

Exoszómák izolálása

Az optimális körülmények között inkubált melanoma sejtek felülűszóját a sejttörmelések kiüleptítése érdekében 3.900 g-vel 15 percig 4 °C-on centrifugáltuk, majd 0,2 µm pórusátmérőjű szűrővel szűrtük és 150.000g-vel 1 órán keresztül 4 °C-on ultracentrifugáltuk. A keletkezett pelletet foszfát pufferrel (PBS) 2x mostuk, összegyűjtöttük és későbbi felhasználásig -80 °C-on tároltuk.

Makrofág sejtenyészet

NF-κB-Luc plazmával transzfektált Raw 264.7 makrofág sejteket MIX MEM (DMEM; Sigma, Cat.No.: D-7777, F12-HAM; Sigma, Cat.No.: F-4135, 1:1 arányban) médiumban tenyésztettük, mely tartalmazott 10% FCS szérumot (Sigma, Cat.No.: F-4135). Inkubációs hőmérséklet: 37°C, 5% CO₂ tartalom mellett.

Dendritikus sejtek

Dendritikus sejteket 8-10 hetes nőstény C57BL/6 egerekből származó csontvelőből nyertünk, melyeket RPMI-1640 (Mediatech, Herndon, VA) médiumban

tenyésztettük, 10% FBS-t (HyClone, Logan, Utah), 2 mM glutamin, 100 U/ml penicillin és streptomycin (Quality Biological, Gaithersburg, MD), 20 ng/ml rekombináns rágcső GM-CSF hozzáadásával.

CD4+ sejtek

8-10 hetes C57BL/6 nőstény egerek lépéből tisztítottunk CD4+ sejteket Mouse T Cell CD4 Subset Column Kit (R&D Systems (Minneapolis, MN) segítségével.

II. Strukturális vizsgálat

Az exoszómák strukturális vizsgálatát az SzBK Biofizikai Intézetében Dr. Siklós László és Dr. Szegletes Zsolt vezetésével Nagy Krisztina végezte.

Az atomerő mikroszkópos (AFM) mérés Asylum MFP-3D fejjel és Molecular Force Probe 3D vezérlővel (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) történt, MFP-3D Xop program használatával (IGOR Pro software, version 5.03, Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA).

Az elektron mikroszkópos vizsgálatához az exoszóma pelletet 0.1M-os PBS-ben mosták, majd egy éjszakán át fixálták 2% paraformaldehidet és 2,5% glutáraldehidet tartalmazó 0,1M-os foszfát puffer (PB) oldatban. Ezt követte két mostás 0,1M-os PB-ben 30 percenként, majd 1 órás 1% vizes ozmium-tetroxidos kezelés (OsO_4). 3x30 perces desztillált vizes mosás után felszálló alkoholsorban víztelenítették a pelletet, propilén-oxiddal kezelték és beágyazták (Durcupan ACM). A blokkokat 56°C-on 2 napig polimerizálták, majd ultramikrotómmal (Leica Ultracut S) 60nm-esre vágták. A mintát formvarral bevont rézhálózatra vitték fel, uranil-acetáttal és ólom-citráttal festették, majd elektron mikroszkóppal vizsgálták (Zeiss CEM 902). A felvételek 85,000× és 140,000× nagyításon készültek 4 M pixeles monokróm CCD kamera segítségével (Diagnostic Instruments, Model #14).

III. In vitro vizsgálatok

Luciferase Assay

Első nap a Raw/ NF- κ B-Luc makrofág sejteket tripszinezést követően 96 lyukú luminoplate-be (Corning-Costar Assay Plate, Cat.No.: 3903) ültettük ki, lyukanként 1×10^5 sejtet 200 μ l megfelelő médiumban. Másnap, a tápoldat eltávolítását követően hozzáadtuk az inducereket és azok kontrolljait, lyukanként 200 μ l végtérfogatban. Az indukció abszolút kontrolljaként a saját médiumot, pozitív kontrollként LPS-t (100ng/ml) használtunk. A melanoma sejtvonal felülúszójából nyert exoszómákat 100 μ l/ml koncentrációban adtuk a makrofág sejtekhez. Kontrollként PBS-t (100 μ l/ml), használtunk. 6 órás inkubációt követően a sejteket 200 μ l PBS-sel mostuk. 20 μ l 1-szeres hígítású lízis puffer (Promega, Cell Culture Lysis Reagent 25x, Cat.No.: E153A) és 20 μ l szubsztrát (Promega, Bright-Glo Luciferase Assay Substrate, Cat.No.: E2620) hozzáadása után luminométerrel (Luminoscan Ascent, Thermo Labsystem, USA) mértük a luciferáz aktivitást.

Proteome Profiler Array (Mouse Citokine Array, R&D Systems, Inc. Cat.No.: ARY006)

Első nap a Raw makrofág sejteket kiültettük 24 lyukú mikrotiter lemezbe (Orange Tissue Culture Plate, Cat.No.: 5530305), lyukanként 1×10^6 sejtsszámmal. A sejtek letapadását követően, másnap hozzáadtuk a B16F1 melanoma exoszómákat. 24 órán keresztül inkubáltuk, majd a felülúszóból fugálást követően a nitrocellulóz membránra pontokban felvitt antitestek (mikroarray) segítségével határoztuk meg a makrofágok termelte citokinek relatív mennyiségét. A kísérlet menetében a mellékelt protokollra támaszkodtunk. A sejt kultúra felülúszóját a biotinilált detekciós antitestekkel elegyítettük, majd a nitrocellulóz membránnal inkubáltuk. A képződött citokin-antitest komplexek kötődtek a membránon immobilizált antitestekhez, a nem kötődöttet mosással eltávolítottuk. Hozzáadtuk a Streptavidin-HRP és a kemilumineszcens reagenseket. Ennek következtében minden detekciós pont a kötődött citokin-antitest komplex mennyiségével arányosan bocsátott ki fényt. Az előhívást röntgen filmre, a Western blot technika szerint végeztük.

Dendritikus sejt indukció

A 6 napos, egér csontvelőből származó dendritikus sejt kultúrát B16F1 exoszómával, B16F1 felülúszóval, LPS-sel, rekombináns RANTES kemokinnel (1 µg/ml) (Peprotech) indukáltuk előkezelésként. Abszolút kontrollnak a dendritikus sejtek saját médiumát használtuk.

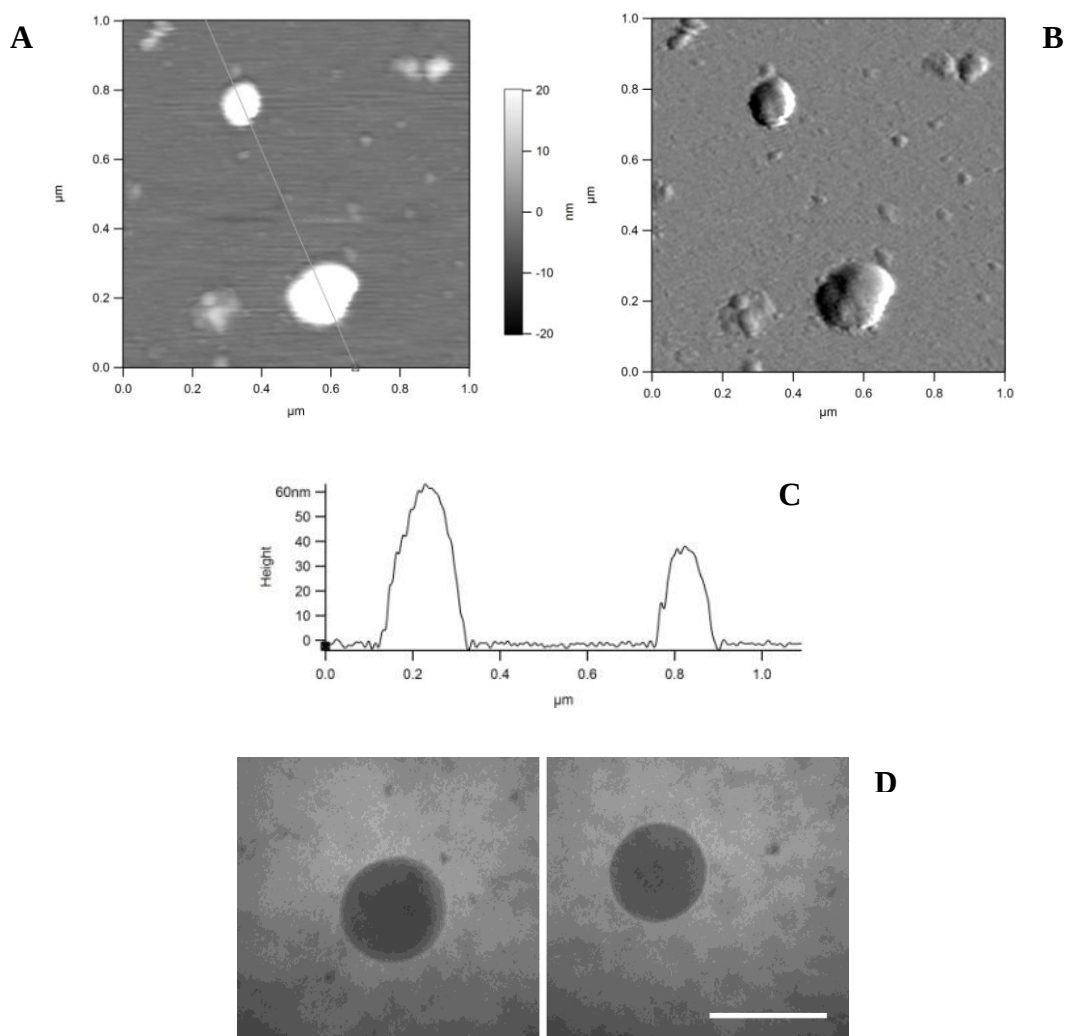
T-sejt proliferációs assay

A CD4⁺ T-sejteket (5×10^5 sejt/lyuk) U-aljú 96 lyukú mikrotiter lemezen együtt inkubáltuk az előzetesen indukált dendritikus sejtekkel (10^4 sejt/lyuk), majd 72 óra múltán vizsgáltuk a proliferációt timidin inkorporációs assay-ben. (1 µCi [³H] thymidine lyukanként az inkubáció utolsó 6 órájában.) Ezen kívül sor került a T-sejtek saját proliferációs kapacitásának egyedi mérésére, illetve pozitív kontrollként használt anti-CD3 és anti-CD28 (2,5 µg/ml) (BD Biosciences, San Jose, CA) hozzáadásával.

Eredmények

I. Strukturális vizsgálatok

Az atomerő mikroszkópos analízis során megállapítást nyert, hogy a melanoma sejtek felülúszójából 20-70 nm átmérőjű, gömb alakú struktúrákat izoláltunk. A transzmissziós elektron mikroszkópos vizsgálat alapján az izolált mikrovezikuláink nem tartalmaznak vírus partikulumokat.

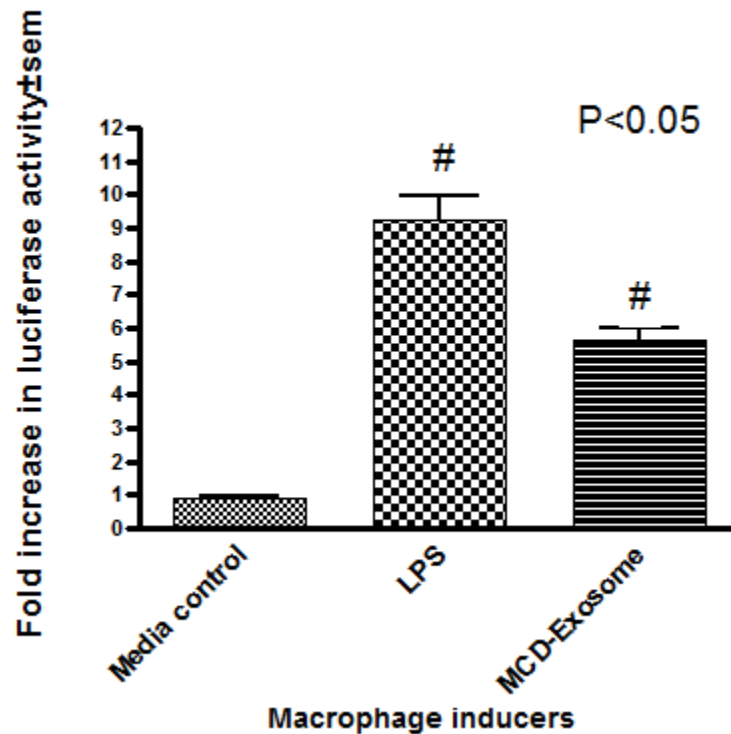


7. ábra. Atomerő mikroszkópos magasság (A) és amplitúdó (B) kép, magasság profil (C) az exoszómákról pufferben mérve mica felületen. Transzmissziós elektron mikroszkópos felvétel a B16F1 exoszómákról. (D)

II. Funkcionális *in vitro* vizsgálatok

Luciferase Assay

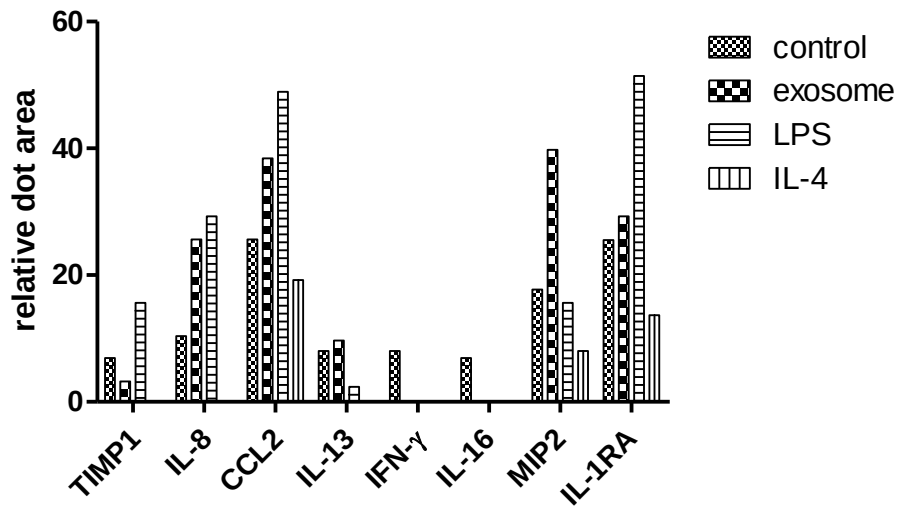
A luciferáz aktivitás alapján a melanoma sejtvonal eredetű exoszómák növelték a Raw makrofág sejtek NF- κ B transzkripciós faktor aktivitását. Az aktivitás mértéke nem érte el az indukereként szokásosan használt 100 ng/ml koncentrációjú LPS (pozitív kontroll) hatására bekövetkező változást, de nagyságrendileg megközelíti azt. Az abszolút kontrollhoz képest szignifikáns növekedést tapasztaltunk a makrofágok NF- κ B aktivitásában.



8. ábra. A makrofág indukció eredménye az NF- κ B aktivitás vizsgálatáról a relatív luciferáz egységek függvényében a saját tápoldat (ctrl), LPS (pozitív kontroll) és az exoszómák hatására.

Proteome Profiler Array

A B16F1 exoszómákkal, LPS-sel, IL-4-el és kontrollként saját médiumban inkubált makrofág sejtek felülszójából határoztuk meg a citokinek, kemokinek mennyiségét. LPS-t használtunk az Th1 irányú polarizáció, IL-4-et a Th2 irányú polarizáció inducereként.

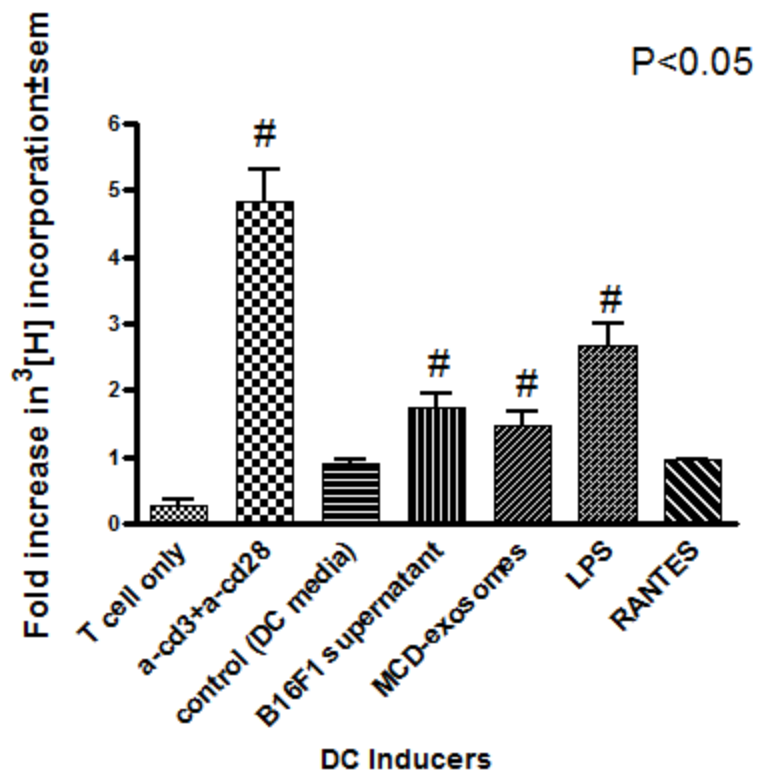


10. ábra. A Proteome Profiler Array alapján a kontroll, az exoszóma, az LPS és az IL-4 indukció hatásának összehasonlítása a fontosabb citokinek kiemelésével.

T-sejt proliferációs assay

B16F1 melanoma exoszómák a dendritikus sejtek révén szignifikánsan fokozták a CD4⁺ T-sejtek osztódását. Az exoszómák, illetve a B16F1 felülűszó hatásának vizsgálatához abszolút kontrollként a DC-ek saját médiumát, pozitív kontrollként LPS-t, funkcionális negatív kontrollként RANTES kemokint alkalmaztunk. A kísérlet háttereként a T-sejtek saját proliferációs aktivitását mértük, a maximális proliferációs képességet pedig anti-CD3, anti-CD28 antitestek hozzáadásával értük el.

Áramlási citometriás mérésekkel meghatároztuk a proliferálódó T sejtek fenotípusát is CD4, CD25 és CD44 vonatkozásában. Az LPS, IL-4 illetve exosomális indukció egyértelműen és szignifikánsan növelte a T sejt proliferációt, az említett markerek egyik stimulus hatására sem tértek el szignifikáns mértékben egymástól.



11. A timidin inkorporációs assay eredménye. Timidin beépülés / T-sejt proliferáció a DC indúcerek függvényében.

Legfontosabb eredmények

- A jól reprodukálható és megbízható minőségű exoszóma preparátumok készítése sikeres volt.
- Atomerő mikroszkópia és elektromikroszkópos vizsgálatok egyértelműen vizualizálták a várt méretű és megfelelő formájú nanopartikulák jelenlétét az izolátumokban.
- Melanoma sejtvonalból nyert exoszómák az általuk kiváltott NF- κ B aktivitás eredményeire alapozva immunológiailag aktívnak bizonyultak makrofág kultúrákban *in vitro*.
- Melanoma exoszómák az általuk indukált citokin illetve kemokin profil alapján feltételezhetően tumortámogató irányba polarizálják *in vitro* a makrofág sejteket.
- A B16F1 exoszómák interakcióba léptek a dendritikus sejtekkel, elősegítették azok aktivációját.
- Az exoszómákkal aktivált dendritikus sejtek CD4⁺ T-limfociták fokozott osztódását eredményezték.

Diszkusszió

Az exoszómák szerepének kutatása az immunológia viszonylag új, de gyorsan fejlődő területe. Kísérletsorozatunk kezdetekor még nem állt rendelkezésre olyan specifikus immunológiai marker, amivel egyértelműen azonosíthattuk volna az preparatumainkban jelen lévő részecskéket. Ezért nagyon komoly hangsúlyt kapott munkánk kezdeti fázisában a részecskék vizualizálása. A mikroszkópos vizsgálatok során bizonyítást nyert, hogy a tumorokból származó exoszómákhoz viszonyítva megfelelő méretű és struktúrájú vezikulákat tisztítottunk fugálásokkal és differenciál-szűréssel, melyek nem tartalmaznak virális partikulumokat és további kísérletekhez felhasználhatók.

Eredményeink alapján kimondhatjuk, hogy a melanoma sejtekből származó exoszómák *in vitro* immunmoduláló hatásának bizonyultak makrofágok és denritikus sejtek tekintetében. Kísérletünkben a makrofágok Luciferase Assay-ben detektált NF- κ B transzkripció faktor aktivitásának növekedése arra enged következtetni, hogy az exoszómák hatására a sejtek aktivált állapotba kerültek, citokin termelésük indukálódott.

Az NF- κ B transzkripció faktor megkérdőjelezhetetlen szerepet játszik a makrofágok M1 és M2 irányú stimulusokra adott génexpressziós válaszaiban egyaránt. (23) Aktiválódása az exoszómális indukció következtében jelezheti a tumorból származó mikrovezikulák szerepét a daganat menekülési mechanizmusaiban és túlélésében. További információk érdekében vizsgáltuk az indukált makrofágok citokin és kemokin termelését, melynek eredményeként a Th1 és Th2-es típustól eltérő profilt kaptunk.

A 11. ábrában kiemelt molekulák közül a szöveti mátrix metalloproteináz inhibitor-1-nek (TIMP-1) előnyös és hátrányos hatásai is vannak a tumor fejlődését illetően. Egyrészt a mátrix metalloproteinázok és az angiogenezis gátlójaként hátráltathatja a metasztázis képzést, másrészt elősegítheti a daganatsejtek túlélését. (36) Exoszómális indukció hatására a makrofágok csökkent mennyiségben termelték, ezen tulajdonság pedig kedvezhet a tumorok terjedésének. Az IL-8 pro-inflammatorikus tulajdonságain kívül fontos szerepet játszik a melanoma növekedésének támogatásában. (37) Ezen citokintről tudott, hogy melanoma sejtek hatására megnő az expressziója a polimorfonukleáris neutrofil sejtekben, ezzel hozzájárul a mikrokörnyezet kialakításához.

(38) Kísérletünkben mennyisége az exoszómák hatására a makrofág felülúszóban a kontrollhoz képest megnövekedett. Hasonló megállapítást tehetünk a CCL2 kemokin esetében is. A CCL2 mint monocita kemoattraktáns protein-1 is ismert, hatását monocitákra, T-sejtekre és NK sejtekre is kifejti. (39) Emelkedett szintje szintén jelzi az exoszómák hozzájárulását a mikro környezet alakításához. Az IL-13 a Th2 típusú citokinekhez tartozik, szerepet játszik a Th1-es típusú anti-tumor válasz elnyomásában. (40) Az IFN γ magas expressziója a Th1-es sejtek jellemzője, mellyel más immunsejtek citotoxikus aktivitását növelik. Kísérletünkben lecsökkent a mennyisége az exoszóma kezelést követően. Az IL-16 csökkent szintet mutatott, ezen citokin szerepe a Th1-es válasz propagálásában és a Th2-es elnyomásában ismert. (40) A MIP-2, makrofág inflammatorikus protein-2 különféle tumorokban fokozza az angiogenezist és segíti a tumorsejtek migrációját. (41) Az IL-1Ra szintje közel megegyezett a kontrollban mérttel. Expressziója ugyanazon jelek hatására indul meg, mint amelyek az IL-1 szintézisét és szekrécióját kiváltják, de mivel hiányzik egy interakciós doménje, az IL-1 szignalizációs kaszkád inhibitoraként funkcionál. A kettő egyensúlya az adott szöveti környezet függvénye. Hatását a tumoros folyamatok gátlásában fejt ki. (40)

A melanoma exoszómák T-sejt proliferációra gyakorolt hatását timidin inkorporációs assay-ben vizsgáltuk. Az exoszómák elősegítették a csontvelői dendritikus sejtek érését, melyek szignifikáns mértékű T-sejt osztódást idéztek elő ($P < 0,05$). Megállapításunk ellentmond korábbi feltételezéseknek, miszerint tumorokból származó exoszómák inhibitoros tulajdonságairól számoltak be dendritikus sejtek érését tekintve. (42)

A tumor exoszómák immunmoduláns hatásairól eltérő adatokat találunk a szakirodalomban, mely nem csak az immunsejteket érintő kommunikációs hálózatok átfedéseinek eredménye, hanem visszavezethető azon egyszerű tényre is, hogy a szekretált mikrovezikulák a kibocsátó sejt membránkarakterisztikáját hordozzák. Ez alapján hatásuk egyértelműen függ a daganat állapotától, aktuális génexpressziós mintázatától, malignitásától.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy a vizsgált B16F1 exoszómák, a Th1-es és Th2-es választól egyaránt eltérő citokin profilt eredményeztek és egyértelműen, statisztikailag is értelmezhető mértékben immunológiailag aktívnak bizonyultak. Mivel a

tumorsejtek által kibocsájtott exoszóma sűrűség nyilvánvalóan a daganat közvetlen környezetében a legnagyobb, ahol a tumor által már daganat-támogató mikrokörnyezet alakult ki, így az exosomák a már jelen lévő aktivitást felerősítve, feltehetően a daganatos folyamatok előrehaladását támogatják. A tumor környezetének ismert interakciói alapján az exoszómák nagy valószínűséggel közreműködnek az immunválasz eltérítésében a melanoma terjedésének kedvező immunszuppresszív irány felé.

Nyilatkozat a pályázó egyéni hozzájárulásáról a pályaműben leírt eredményekhez

Alulírott Temesfői Viktória a dolgozatban leírt munkafolyamatok közül a:

- melanoma sejtek tenyésztését
- exoszómák preparálását
- makrofág sejtek tenyésztését
- makrofág indukciós kísérletet
- Luciferase Assay-t
- Proteoma Profiler Array-t

végeztem el.

.....
Aláírás

Szeged, 2012 december 07.

Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni a lehetőséget, bizalmat és támogatást a témavezetőimnek; Buzás Krisztinának és Duda Ernőnek, a kitartó segítséget és türelmet a gyakorlati munkák során Kúsz Erzsébetnek és Marton Annamáriának, az építő konzultációkat Vizler Csabának.

Köszönet illeti együttműködő partnereinket az SzBK Biofizikai Intézetében; Szegletes Zsoltot, Nagy Krisztinát, és Siklós Lászlót.

Irodalomjegyzék

1. Rigel, D.,S. MD. Epidemiology of Melanoma. *Semin Cutan Med Surg* 2010; 29: 204-209.
2. Hearing, V.J., Leong, S.P.L. *From Melanocytes To Melanoma: The Progression To Malignancy*. Humana Press Inc. 2006. Totowa, New Jersey. ISBN 1-58829-459-5
3. Ossowski, L., Aguirre-Ghiso, J.A. Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010; 23: 41.
4. Ilkovitch, D., Lopez, D.M. Immune modulation by melanoma-derived factors. *Exp Dermatology* 2008; 17: 977-985.
5. Umansky, V., Sevko, A., Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Seminars in Cancer Biology* 2012; 22: 319– 326.
6. Immunosuppression in the tumor microenvironment: Where are we standing? Editorial, *Seminars in Cancer Biology* 2012; 22: 273– 274.
7. Engels, B., Rowley, D.A., Schreiber, H. Targeting stroma to treat cancers. *Seminars in Cancer Biology* 2012; 22: 41– 49.
8. Melnikova, V.O., Bar-Eli, M. Inflammation and melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009; 22: 257–267.
9. Zhang, J., Liu, J. Tumor stroma as targets for cancer therapy. *Pharmacology and Therapeutics* 2012; In Press, Accepted Manuscript
10. Stoorvogel, W., Kleijmeer, M.J., Geuze, H.J., Raposo. G. The Biogenesis and Functions of Exosomes. *Traffic* 2002; 3: 321-330
11. Whiteside, T.L. Tumour-derived exosomes or microvesicles: another mechanism of tumour escape from the host immune system? *Br J Cancer* 2005; 92(2): 209– 211.
12. Keller, S., Sanderson, M.P., Stoeck, A., Altevogt, P. Exosomes: From biogenesis and secretion to biological function. *Immunology Letters* 2006; 107: 102–108.
13. Vlassov, A.V., Magdaleno, S., Setterquist, R., Conrad, R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012; 1820: 940–948.

14. Mathivanan, S., Ji, H., Simpson, R.J. Exosomes: Extracellular organelles important intercellular communication. *Journal of Proteomics* 2012; 73: 1907-1920.
15. Kim, J.W., Wieckowski, E., Taylor, D.D., Reichter, T.E., Watkins, S., Whiteside, T.L. FasL+ membraneous vesicles isolated from sera of patients with oral cancer induce apoptosis of activated T lymphocytes. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 1010.
16. Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Leijendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J., Geuze, H.J. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med* 1996; 183:1161-1172.
17. Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S., Zitvogel, L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001; 7: 297-303.
18. Iero, M., Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Parmiani, G., Fais, S., Rivoltini, L. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* 2008; 15(1):80-8.
19. Théry, C., Zitvogel, L., Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2: 569-579.
20. Hood, J.L., Pan, H., Lanza, G.M., Wickline, S.A. Consortium for Translational Research in Advanced Imaging and Nanomedicine (C-TRAIN). Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab. Invest.* 2009; 89(11): 1317-1328.
21. Hallam, S., Escorio-Correia, M., Soper, R., Schultheiss, A., Hagemann, T. Activated macrophages in the tumour microenvironment – dancing to the tune of TLR and NF- κ B. *J Pathol.* 2009; 219(2): 143-152.
22. Falus András, Buzás Edit, Rajnavölgyi Éva: *Immunológia alapjai*. Semmelweis Kiadó 2007. ISBN 978 963 9656 08 9
23. Biswas, S. K., Lewis C. E. NF- κ B as a central regulator of macrophage function in tumors. *Journal of Leucocyte Biology* 2010; 88: 877-884.

24. Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., Sica, A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 2002; 23: 549-555.
25. Mantovani, A., Sica, A., Allavena, P., Garlanda, C., Locati, M. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Human Immunology* 2009; 70: 325-330.
26. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A., Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: Potential targets of anti-cancer therapy. *European Journal of Cancer* 2006; 42: 717-727.
27. Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., Mantovani, A. The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological Reviews* 2008; 222:155-161.
28. Coquerelle, C., Moser M. Are dendritic cells central to regulatory T cell function? *Immunology Letters* 2008; 119: 12-16.
29. Mahnke, K., Johnson, T.S., Ring, S., Enk, A.H. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: A two-way relationship. *Journal of Dermatological Science* 2007; 46: 159-167.
30. Rajnavölgyi, É., A dendritikus sejtek és terápiás felhasználási lehetőségeik. *Magyar Tudomány* 2003; 4: 440-450.
31. Ma, Y., Shurin, G.V., Gutkin, D.W., Shurin, M.R. Tumor associated regulatory dendritic cells. *Seminars in Cancer Biology* 2012; 22: 298-306.
32. Bennaceur, K., Chapman, J., Brikci-Nigassa, L., Sanhadji, K., Touraine J., Portoukalian, J. Dendritic cells dysfunction in tumour environment. *Cancer Letters* 2008; 272: 186-196.
33. Enk, A.H., Jonuleit, H., Saloga, J., Knop, J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int. J. Cancer* 1997; 73: 309-316.
34. Lin, A., Schildknecht, A., Nguyen. L.T., Ohashi, P.S. Dendritic cells integrate signals from the tumor microenvironment to modulate immunity and tumor growth. *Immunology Letters* 2010; 127: 77-84.

35. Whiteside, T.L. What are regulatory T cells (Treg) regulating in cancer and why? *Seminars in Cancer Biology* 2012; 22: 327-334.
36. Hornebeck, W., Lambert, E., Petitfrère, E., Bernard, P. Beneficial and detrimental influences of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in tumor progression. *Biochimie* 2005; 87: 377–383
37. Kunz, M., Hartmann, A., Flory, E., Toksoy, A., Koczan, D., Thiesen, HJ., Mukaida' N., Neumann, M., Rapp' U.R., Bröcker, EB., Gillitzer, R. Anoxia-Induced Up-Regulation of Interleukin-8 in Human Malignant Melanoma : A Potential Mechanism for High Tumor Aggressiveness. *The American Journal of Pathology* 1999; 155: 753-763.
38. Peng, HH., Liang, S., Henderson, A.H., Dong, C. Regulation of interleukin-8 expression in melanoma-stimulated neutrophil inflammatory response. *Experimental Cell Research* 2007; 313: 551-559.
39. Navarini-Meury, A.A., Conrad, C. Melanoma and innate immunity – Active inflammation or just erroneous attraction?: Melanoma as the source of leukocyte-attracting chemokines. *Seminars in Cancer Biology* 2009; 19: 84-91.
40. Mübeccel Akdis, Simone Burgler, Reto Cramer, Thomas Eiwegger, Hiroyuki Fujita, Enrique Gomez, Sven Klunker, Norbert Meyer, Liam O'Mahony, Oscar Palomares, Claudio Rhyner, Nadia Quaked, Anna Schaffartzik, Willem Van De Veen, Sabine Zeller, Maya Zimmermann, Cezmi A. Akdis. Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2011; 127: 701-721.
41. Kollmar, O., Junker, B., Rupertus, K., Menger, M.D., Schilling, M.K. Studies on MIP-2 and CXCR2 expression in a mouse model of extrahepatic colorectal metastasis. *European Journal of Surgical Oncology* 2007; 33: 803-811.
42. Yu, S., Liu, C., Su, K., Wang, J., Liu, Y., Zhang, L., et al. Tumor exosomes inhibit differentiation of bone marrow dendritic cells. *J Immunol* 2007; 178: 6867–6875.